



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nlegungsschrift  
⑩ DE 43 02 060 A 1

⑥ Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**A61 K 37/54**  
A 61 K 37/62

⑳ Aktenzeichen: P 43 02 060.7  
㉑ Anmeldetag: 26. 1. 93  
㉒ Offenlegungstag: 28. 7. 94

DE 43 02 060 A 1

㉑ Anmelder:

Mucos Pharma GmbH & Co, 82538 Geretsried, DE

㉒ Vertreter:

Grünecker, A., Dipl.-Ing.; Kinkeldey, H., Dipl.-Ing.  
Dr.-Ing.; Stockmair, W., Dipl.-Ing. Dr.-Ing. Ae.E. Cal  
Tech; Schumann, K., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Jakob,  
P., Dipl.-Ing.; Bezold, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;  
Meister, W., Dipl.-Ing.; Hilgers, H., Dipl.-Ing.;  
Meyer-Plath, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Ehnold, A.,  
Dipl.-Ing.; Schuster, T., Dipl.-Phys.; Goldbach, K.,  
Dipl.-Ing.Dr.-Ing.; Aufenanger, M., Dipl.-Ing.;  
Klitzsch, G., Dipl.-Ing.; Vogelsang-Wenke, H.,  
Dipl.-Chem. Dipl.-Biol.Univ. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte,  
80538 München

㉓ Erfinder:

Ransberger, Karl, 8124 Seeshaupt, DE

㉔ Verwendung von Bromelain zur Krebstherapie und/oder Metastasen-Prophylaxe

㉕ Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Bromelain zur Krebstherapie und/oder Metastasen-Prophylaxe. Insbesondere eignet sich Bromelain für die strukturelle Modifizierung der von Krebszellen exprimierten CD44-Oberflächenmoleküle, die für die metastasierenden Eigenschaften von Tumoren verantwortlich sein können.

DE 43 02 060 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 06. 94 408 030/245

9/45

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Bromelain zur Krebstherapie und/oder Metastasen-Prophylaxe.

Als Krebs bezeichnet man die maligne Entartung körpereigener Zellen, die durch fortgesetzte Zellteilung zur Entstehung maligner Neoplasien führt. Krebsgewebe unterscheidet sich vom normalen Gewebe durch unbegrenztes, invasives und destruktives Wachstum, wobei die Neoplasien in das umgebende Gewebe eindringen und dieses zerstören. Für Krebswucherungen wird im allgemeinen ein klonaler Ursprung angenommen. Dabei können die unterschiedlichsten Zelltypen ein bösartiges Wachstum annehmen und somit zu Krebs führen. Man unterscheidet aufgrund des unterschiedlichen histologischen Ursprungs verschiedene Krebsformen, wie Sarkome (mesenchymale Geschwulst), Karzinome (epitheliale Geschwulst), Leukämien, Lymphome, Plasmocytome, Melanome, Glioblastome etc. Sarkome treten z. B. als Geschwulste der Muskeln, der Knochen oder des lymphatischen Systems (maligne Lymphome) auf. Karzinome entwickeln sich unter anderem in der Haut, der Lunge, im Magen und Darm, Prostata, Gebärmutter und weiblicher Brust.

Krebszellen können sich aus dem ursprünglichen Tumor lösen und sind z. B. auf dem Lymph- oder Blutweg zur Bildung von Metastasen (Tochtergeschwülsten) fähig. Die histologische Struktur der Metastasen gleicht meist der des Primärtumors. Man unterscheidet nach dem Fundort lokale Metastasen (in der Umgebung der Primärgeschwulst), regionäre Metastasen, die auf dem Lymphweg entstehen und hämatogene Fernmetastasen.

Während Primärtumore durch Operation entfernt oder durch Bestrahlung und/oder Chemotherapie zerstört werden können, ist die Medizin gegen "vagabundierende" Krebszellen, die später zu Metastasen führen, fast immer machtlos. Daher sterben die meisten Krebspatienten nicht am Primärtumor, sondern an den Metastasen.

Voraussetzung für die Entwicklung einer wirksamen Metastasenprophylaxe und/oder Metastasenbehandlung ist das Verständnis der Mechanismen, wie es den metastasierenden Krebszellen gelingt, die Gefäßwände von Blut- und Lymphbahnen zu durchbrechen und in weit entfernte Körperregionen vorzudringen. Deshalb versuchen seit vielen Jahren Biologen und Mediziner, die biochemischen Mechanismen aufzuklären, die diesem viele Schritte umfassenden Prozeß zugrundeliegen. Eine entscheidende Bedeutung wird dabei bestimmten Oberflächenmolekülen der Krebszellen beigemessen, mit denen diese sich an Zellen heften, die die Blut- und Lymphgefäße auskleiden. Die Adhäsion ermöglicht es den Krebszellen in das, die Blut- oder Lymphgefäße umgebende Gewebe einzudringen und dort Metastasen zu bilden.

Neuere Forschung hat ergeben, daß einer Variante des Oberflächenmoleküls CD44 eine entscheidende Rolle bei der Metastasenbildung zukommt. CD44 ist ein im Menschen vorkommendes, stark glykosiliertes Protein, das auf vielen Zellen, insbesondere des peripheren Blutes, vorhanden ist (M. Stoll in Leukocyte Typing IV, Herausgeber: W. Knapp et al., S. 619—622, Oxford University Press). Varianten dieses Moleküls können auch auf bestimmten Zellen der Haut und auf manchen Epithelzellen in der embryonalen Entwicklung nachgewiesen werden. Alle Varianten bestehen aus einem konstanten Teil (KT) und variablen Teil (VT). CD44-Vari-

ten wurden überraschenderweise auch auf Oberflächen von Tumorzellen nachgewiesen (Arch. R.A. et al., Science 257 (1992), S. 682—685).

Es konnte gezeigt werden, daß die von Krebszellen exprimierte CD44-Variante für die metastasierenden Eigenschaften des Tumors verantwortlich ist. Tumorzelllinien, die sich nur durch das Vorhandensein oder Fehlen von CD44 unterscheiden, führen in vivo entweder zu metastasierenden (CD44+)- oder soliden (CD44)-Tumoren (Arch. R.A. et al., Science 257 (1992), S. 682—685). Die Rolle von CD44 bei der Metastasierung wird zur Zeit noch nicht vollständig verstanden. Es wird die Hypothese diskutiert, daß die Expression dieses Moleküls metastasierende Krebszellen vor einer Attacke durch zytotoxische Zellen des Immunsystems schützt. Die Krebszelle täuscht mit CD44 quasi eine Zelle des Blutes vor. Besondere Eigenschaften von Lymphozyten, wie z. B. die Adhäsion in den Gefäßen des lymphatischen Systems oder die Möglichkeit, Blut- und Lymphbahnen zu verlassen, könnten durch CD44 vermittelt werden. Es ist vorstellbar, daß diese Eigenschaften auf CD44 exprimierende Krebszellen übergehen und dadurch eine Metastasierung erleichtern.

Es ist experimentell gesichert, daß monoklonale Antikörper (mAK), die gegen CD44 gerichtet sind, die Ausbreitung von Metastasen verhindern können.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Arzneimittels, das das Metastasierungspotential von Krebszellen reduziert.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs und/oder der Verhütung der Metastasierung die pflanzliche Protease Bromelain verwendet wird.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß proteolytische Enzyme, insbesondere Bromelain, verschiedene Epitope des CD44-Oberflächenmoleküls strukturell modifizieren. Wegen des hohen Glykosilierungsgrades der CD44-Varianten ist dieser Befund nicht vorhersehbar gewesen. Durch die enzymatische Strukturmodulation von CD44 verliert die Zelle ihre metastasierenden Eigenschaften.

Bromelain kann somit für die Krebstherapie und/oder Metastasen-Prophylaxe verwendet werden. CD44-vermittelte Tumoren bzw. Krebszellen sind z. B. Ovarialkarzinome, Kolonkarzinome, Melanomzellen, myeloische Zellen u. a.

Die pflanzliche Protease Bromelain hat sich erfindungsgemäß als besonders wirkungsvoll erwiesen; jedoch wird der vorteilhafte Effekt von Bromelain durch die Verwendung weiterer Enzyme, wie z. B. Papain, Trypsin, Lipase, Amylase, Chymotrypsin und/oder Pankreatin, unterstützt.

Die erfindungsgemäß verwendete pflanzliche Protease Bromelain ist nach üblichen Methoden aus dem Preßsaft der Ananas isolierbar.

Papain ist ein proteolytisches Enzym, das aus dem Milchsafte der unreifen, fleischigen Früchte des Melonenbaums *Carica papaya* mit üblichen Methoden herstellbar ist.

Trypsin und Chymotrypsin sind proteolytische Enzyme, die bekanntermaßen aus Pankreas gewonnen werden können.

Lipasen gehören zu der Untergruppe der Esterasen und werden aus Pankreas oder dem Pilz *Rhizopus arrhizus* isoliert.

Amylasen sind Glykosid-spaltende Enzyme, die beispielsweise aus Pankreas oder speziellen Mikroorganismen gewonnen werden.

Vorzugsweise wird als Lipase Triacylglycerollipase und/oder als Amylase  $\alpha$ -Amylase verwendet. Pankreatin wird üblicherweise aus Schweine- oder Rinderpankreas isoliert.

Eine besonders gute Wirksamkeit hat die kombinierte Verwendung von 50 bis 200 mg, vorzugsweise 100 mg Pankreatin, 20 bis 100 mg, vorzugsweise 45 mg Bromelain, 40 bis 100 mg, vorzugsweise 60 mg Papain, 5 bis 50 mg, vorzugsweise 10 mg Triacylglycerollipase, 5 bis 50 mg, vorzugsweise 10 mg  $\alpha$ -Amylase, 10 bis 30 mg, vorzugsweise 24 mg Trypsin, 1 bis 10 mg, vorzugsweise 1 mg Chymotrypsin pro Dosisseinheit.

Weiterhin können vorzugsweise zusätzlich Rutosid, ein zu den Flavonoiden gehörendes Glykosid, und/oder Serratia-Peptidase (aus Mikroorganismen der Gattung *Serratia*) verwendet werden.

Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten, die die erfindungsgemäßen Enzyme enthalten, können weiterhin die üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffe verwendet werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

#### Beispiel 1

$2 \times 10^5$  Zellen (z. B. aktivierte T-Lymphozyten oder Zellen der leukämischen Zelllinien U937 und MOLT 4/8) in 80  $\mu$ l serumfreiem Medium wurden mit 20  $\mu$ l einer Protease-Lösung (Bereich der Endkonzentration 40,0–2,50  $\mu$ g Protease/ml) versetzt und 1 Stunde bei 37°C im Inkubationsschrank (100% Luft, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte zweimaliges Waschen der Zellen mit Phosphat-gepuffelter, isotonischer Kochsalzlösung pH 7,3 (PBS); der durch das Waschen bedingte Verdünnungsfaktor war 1 : 2500.

Nach dem Waschen wurden die Zellen in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen und mit einem CD44-spezifischen monoklonalen Antikörper (100 ng/ml), welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z. B. Fluoreszeinisothiocyanat, konjugiert war bei 4°C 30 Minuten lang markiert.

Durch zweimaliges Waschen mit PBS wurde der überschüssige, ungebundene Markierungsantikörper entfernt. Die Zellen wurden dabei durch Zentrifugation vom Waschmedium getrennt.

Nach Aufnahme der Zellen in 100  $\mu$ l PBS wurden die Analysenproben bis zur Messung in einem Eisbad aufbewahrt. Die Messung der Dichte der Antikörper-markierten CD44-Oberflächenmoleküle erfolgte mit Hilfe eines Durchflußzytometers.

Durch Vergleich der Meßdaten von Protease-behandelten Zellen und Referenzproben, konnte die spezifische, CD44-Struktur-modulierende Eigenschaft der Proteasen bestimmt werden.

In den Fig. 1 bis 6 sind einige Ergebnisse der durchgeführten Versuchsreihen graphisch dargestellt.

Fig. 1a und 1b veranschaulichen die Änderung der relativen Dichte der Epitope L-178 (Fig. 1a) und J-173 (Fig. 1b) des CD44-Moleküls nach Behandlung von Zellen der leukämischen T-Zelllinie MOLT 4/8 mit verschiedenen Konzentrationen der pflanzlichen Proteasen Bromelain und Papain.

Fig. 2 veranschaulicht die Änderung der relativen CD44-Dichte durch Behandlung von Zellen der leukämischen T-Zelllinie MOLT 4/8 mit den pflanzlichen Proteasen Bromelain und Papain.

Die Fig. 3 und 4 zeigen die Abhängigkeit der Veränderung des Epitops L-178 des CD44-Moleküls auf Zellen der leukämischen T-Zelllinie MOLT 4/8 von der

Konzentration der pflanzlichen Proteasen Bromelain (Fig. 3) und Papain (Fig. 4).

Die Fig. 5 und 6 veranschaulichen die Veränderung des Epitops L-178 des CD44-Moleküls auf Zellen der leukämischen T-Zelllinie MOLT 4/8 durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin-komplexierte Proteasen nach einstündiger Inkubation (Fig. 5) und vierstündiger Inkubation (Fig. 6) bei 37°C.

Die in den Fig. 1 bis 4 dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die pflanzliche Protease Bromelain das CD44-Oberflächenmolekül in einer Weise verändert, daß dieses nicht mehr von spezifischen monoklonalen Antikörpern erkannt wird. Unterschiedliche Epitope von CD44 werden dabei in einem unterschiedlichen Ausmaß strukturell moduliert (vgl. Fig. 1a und 1b). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß Bromelain im Vergleich zu Papain eine höhere Wirksamkeit hinsichtlich der Modifizierung des stark glykosylierten CD44-Antigens besitzt. Aus den Fig. 5 und 6 geht hervor, daß Bromelain durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin nicht entscheidend gehemmt wird.  $\alpha_2$ -Makroglobulin ist ein Proteaseinhibitor, der u. a. im menschlichen Blutserum vorkommt.

Da Bromelain das CD44-Oberflächenmolekül strukturell moduliert, ist diese pflanzliche Protease für die Verhinderung der Metastasierung von Krebszellen bzw. zur Therapie von Krebs geeignet.

#### Patentansprüche

1. Verwendung von Bromelain zur Krebstherapie und/oder Metastasen-Prophylaxe.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich mindestens eine weitere pflanzliche Protease verwendet wird.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als weitere pflanzliche Protease Papain verwendet wird.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich mindestens eines der Enzyme Trypsin, Lipase, Amylase, Chymotrypsin und/oder Pankreatin verwendet wird.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Lipase Triacylglycerollipase verwendet wird.
6. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Amylase  $\alpha$ -Amylase verwendet wird.
7. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Rutosid verwendet wird.
8. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß 50 bis 200 mg, vorzugsweise 100 mg Pankreatin, 20 bis 100 mg, vorzugsweise 45 mg Bromelain, 40 bis 100 mg, vorzugsweise 60 mg Papain, 5 bis 50 mg, vorzugsweise 10 mg Triacylglycerollipase, 5 bis 50 mg, vorzugsweise 10 mg  $\alpha$ -Amylase, 10 bis 30 mg, vorzugsweise 24 mg Trypsin, 1 bis 10 mg, vorzugsweise 1 mg Chymotrypsin pro Dosisseinheit verwendet werden.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich 10 bis 100 mg, vorzugsweise 50 mg Rutosid  $\times$  3H<sub>2</sub>O pro Dosisseinheit verwendet werden.
10. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Serratia-Peptidase verwendet wird.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Abb. 1a

Modulation des CD44-Epitopes L-178

durch proteolytische Enzyme nach 1 Stunde

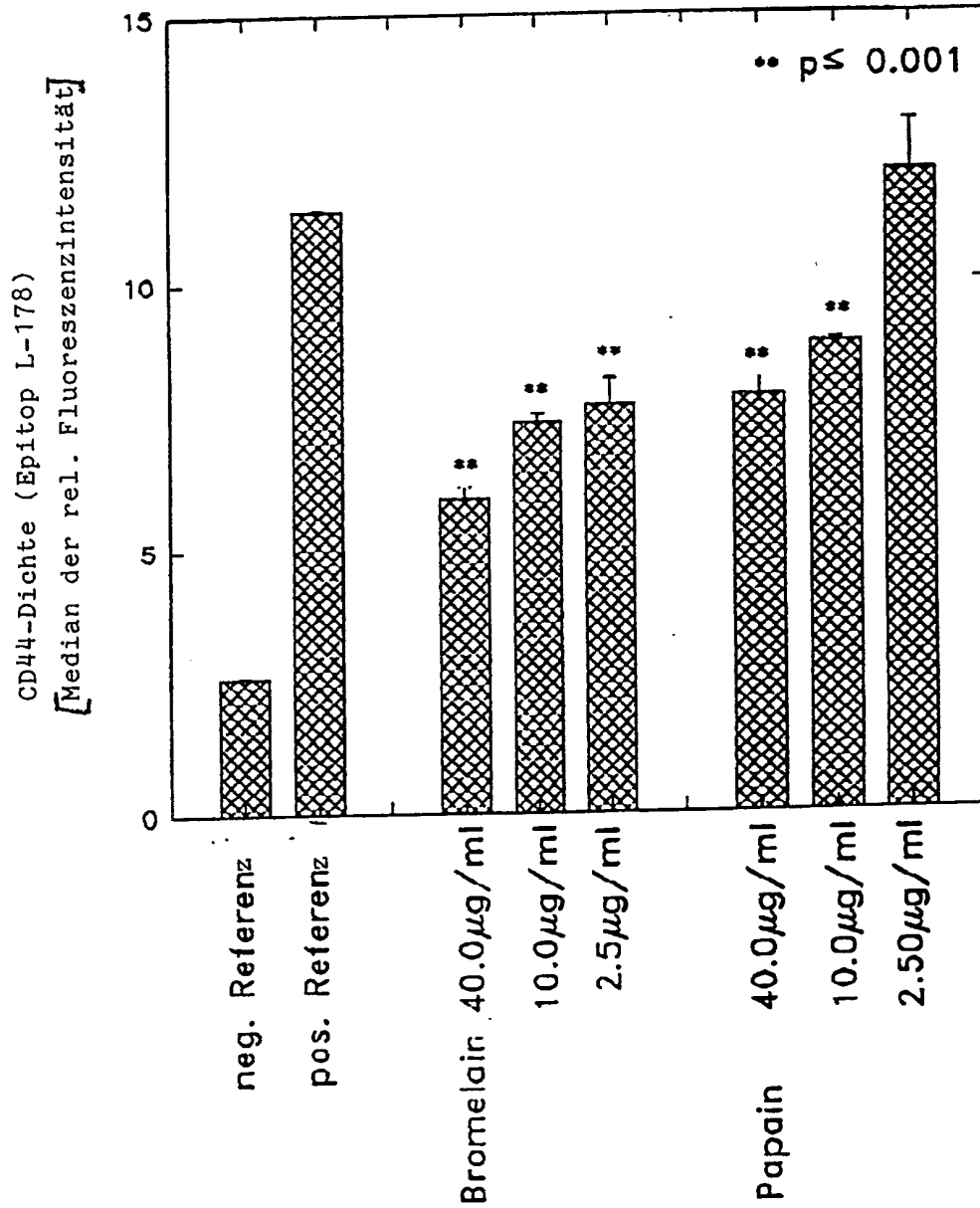
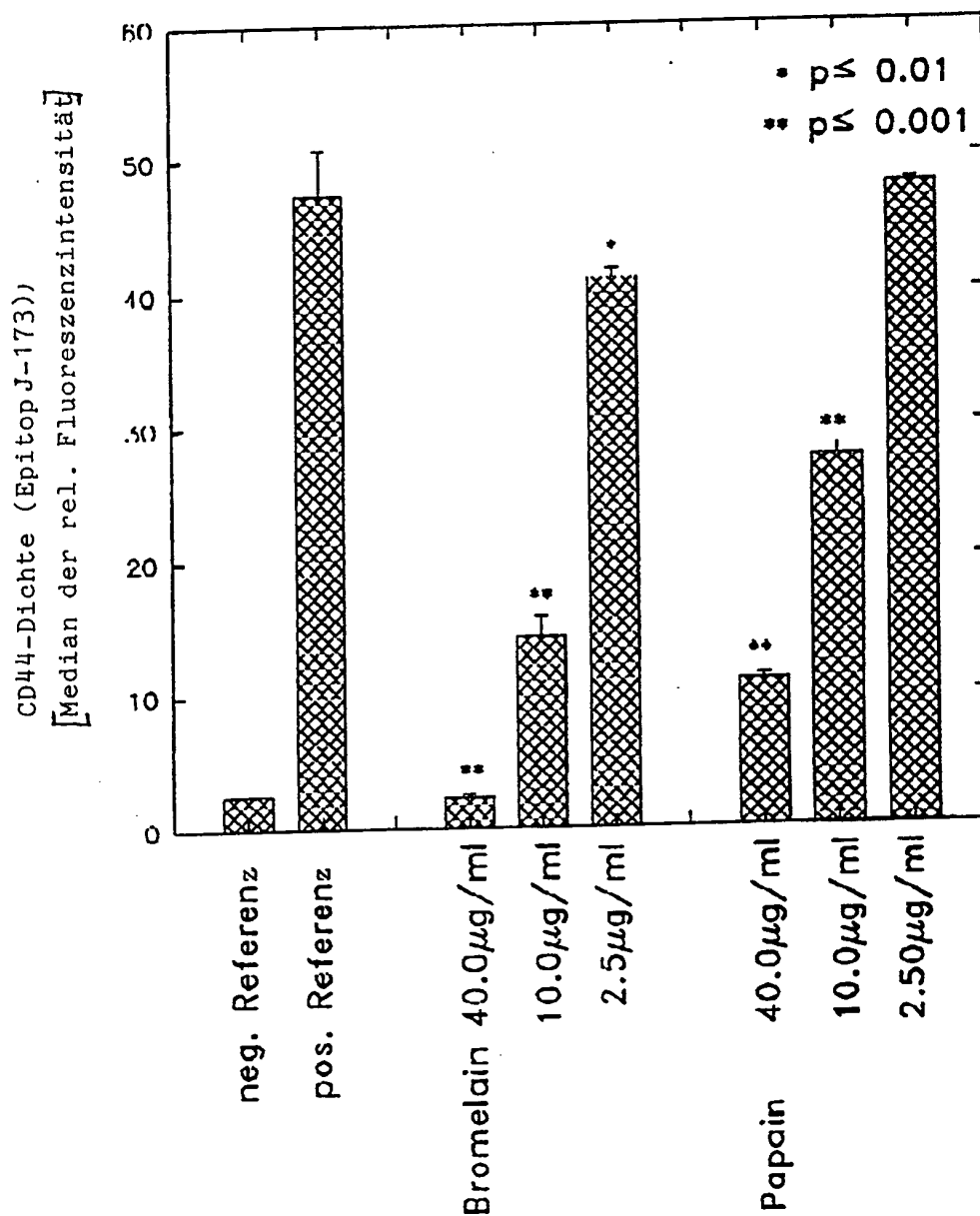


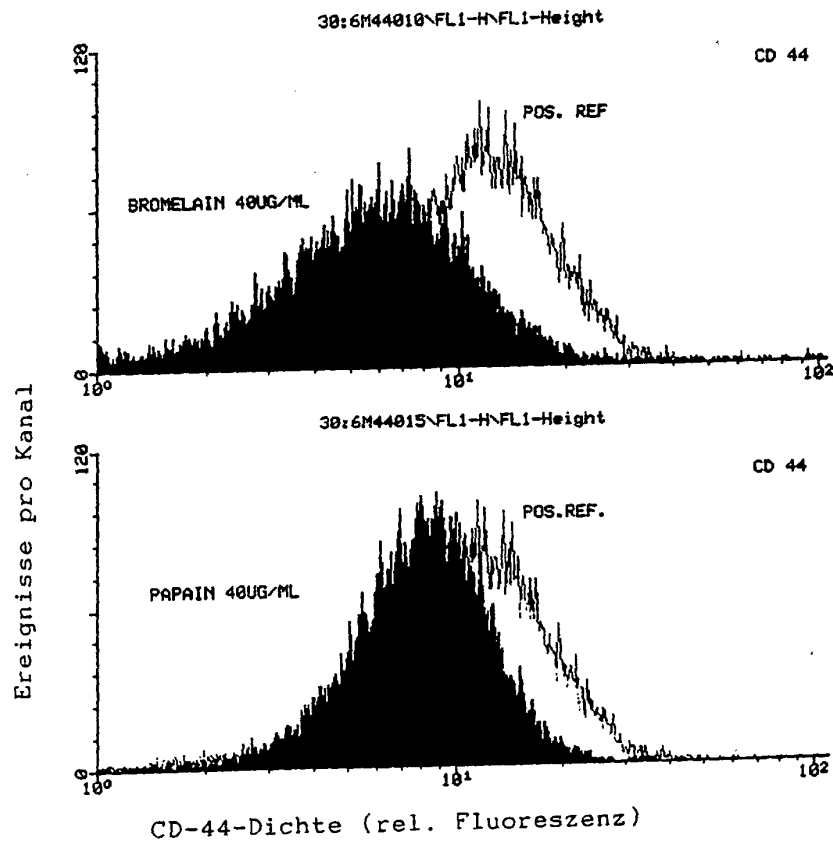
Abb. 1b

Modulation des CD4<sup>4</sup>-Epitopes J-173  
durch proteolytische Enzyme nach 1 Stunde



Figur 2

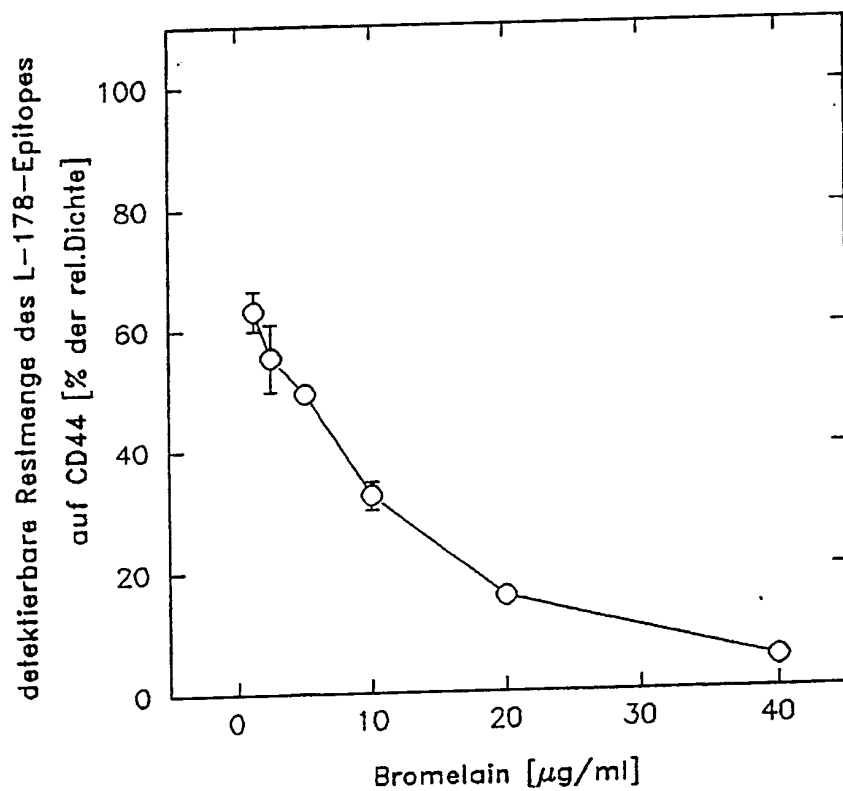
Änderung der relativen CD44-Dichte (Epitop L-178)  
 auf der leukämischen T-Zelllinie MOLT 4/8 durch  
 Proteasen (40µg/ml, 1h)





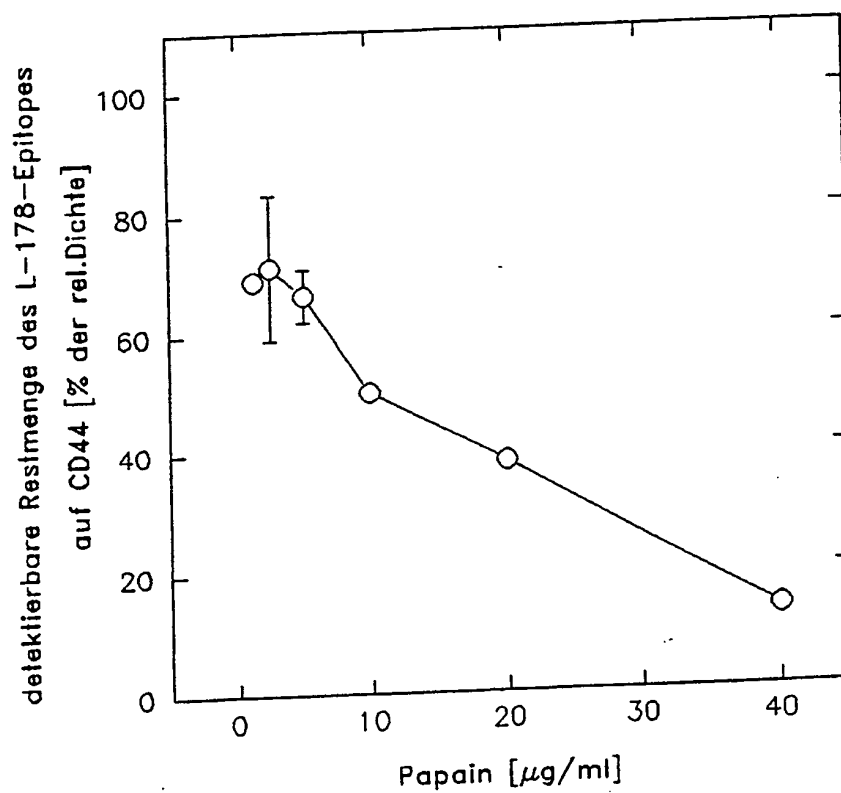
Figur 3

Konzentrationsabhängigkeit der Modulation  
des L-178 Epitopes des CD44-Moleküles



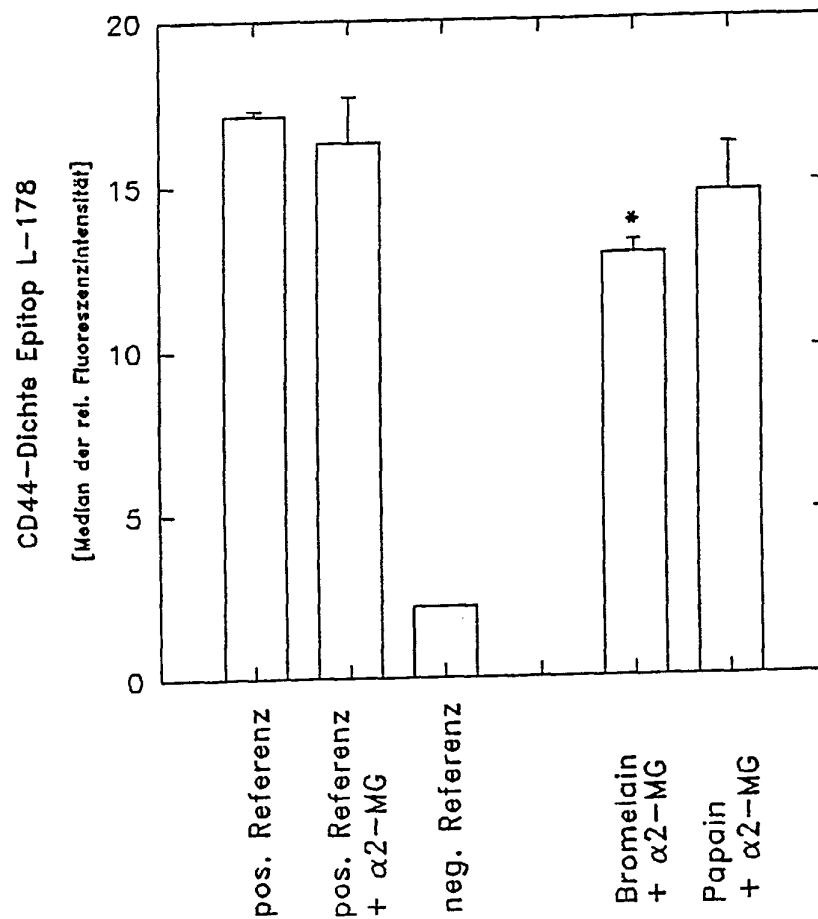
Figur 4

Konzentrationsabhängigkeit der Modulation  
des L-178 Epitopes des CD44-Moleküles



Figur 5

Modulation des L-178 Epitopes des CD44-Moleküles durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ -MG)-komplexierte Proteasen (10  $\mu$ g/ml) nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C.



\*  $p \leq 0.01$

Figur 6

Modulation des L-178 Epitopes des CD44-Moleküles durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ -MG)-komplexierte Proteasen (10  $\mu$ g/ml) nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C.

